



(19) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

(12) f nl gungsschr  
(10) DE 4411425 A1

(51) Int. Cl. 6:  
**A 61 K 39/00**  
A 61 K 38/19  
A 61 K 39/39

(21) Aktenzeichen: P 44 11 425.7  
(22) Anmeldetag: 5. 4. 94  
(43) Offenlegungstag: 19. 10. 95

(71) Anmelder:  
Falkenberg, Frank W., Prof. Dr., 58456 Witten, DE

(72) Erfinder:  
Falkenberg, Frank W., 58456 Witten, DE; Reimer,  
Martina, 44892 Bochum, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Verfahren zur Herstellung einer Tumorvakzine für die Aktive Spezifische Immuntherapie (ASI)

DE 4411425 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen  
BUNDESDRUCKEREI 08.95 508 042/23

Die Behandlung von Tumorerkrankungen durch Vakzinierung von Patienten mit ihren eigenen inaktivierten Tumorzellen ist in den letzten Jahrzehnten in einer Reihe von Veröffentlichungen beschrieben und in vielen Studien erprobt worden (1). Es hat sich dabei gezeigt, daß die Beimischung eines Adjuvants notwendig ist, um das Immunsystem des Patienten gegen die autologen Tumorzellen stimulieren zu können. In den ersten Versuchen dieser Art wurde BCG (Bacille Calmette Guerin) verwendet (2). Später wurden den Patienten Tumorzellen, vermischt mit inaktivierten BCG appliziert. Peters et al. (3) konnten im Tierversuch belegen, daß diese Methode tatsächlich zur Induktion einer Tumor-spezifischen Immunantwort führt.

Verschiedene Gruppen führten weltweit ähnliche Versuche bei anderen Tumoren durch. In diesem Zusammenhang seien die Arbeiten von Tallberg et al. (4) erwähnt. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, daß die Applikation von inaktivierten Tumorzellen zusammen mit einem bakteriellen Adjuvants zur signifikanten Verbesserung der Überlebensrate von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom führte.

Cassel et al. (5) verwendeten für solche Behandlungsversuche von Patienten mit malignen Melanomen Newcastle Disease Virus (NDV) als Adjuvants und erreichten damit ebenfalls Verbesserungen der statistischen Überlebensrate der Patienten. Schirrmacher et al. (6) griffen diesen Ansatz auf und zeigten im Tierversuch, daß die Applikation von Tumorzellen, die mit dem humanapathogenen NDV infiziert worden und anschließen mit 200 Gy bestrahlt worden waren, in den Tieren eine bleibende T-Zell-Immunität gegen Antigene der Zellen des verwendeten Tumors (Esb) induzierten (7). Sie konnten ferner zeigen, daß diese Immunität gegen den Tumor zellgebunden war und durch Zellen adoptiv auf andere Tiere übertragen werden konnte (8). Dieser Ansatz ist inzwischen von verschiedenen Gruppen in Deutschland übernommen worden, und zur Zeit (1993/94) wird eine Reihe von Studien nach diesem Schema durchgeführt.

In einer zunächst davon unabhängigen Entwicklung hat sich gezeigt, daß Zytokine ebenfalls eine Wirkung auf das Tumorwachstum haben können. Hier wurde vor allem das Interleukin-2 (IL-2) eingesetzt, da es gelang, dieses Zytokin schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Entwicklung gentechnisch zu produzieren und der klinisch-wissenschaftlichen Forschung in therapeutisch sinnvollen Mengen zur Verfügung zu stellen. Mit systemisch appliziertem rIL-2 sind dabei Effekte erreicht worden (9, 10), jedoch führt die systemische Applikation von IL-2 auch zu schweren Nebenwirkungen, selbst zu therapiebedingten Todesfällen. Außerdem ist dieses Verfahren mit beträchtlichen Kosten verbunden, die leicht die Größenordnung von 30 000 bis 50 000 DM bei einem Patienten erreichen können.

Die schweren Nebenwirkungen sind verständlich, betrachtet man die hohen Dosen, die bei dieser Applikationsform dem Patienten zugeführt werden müssen, um überhaupt einen Effekt zu erreichen. Zytokine sind eigentlich "short-range substances", die der Kommunikation zwischen nahe beieinander liegenden Zellen dienen. Werden solche Substanzen systemisch angewendet, dann kann die "Überschwemmung" des Organismus mit diesen normalerweise nur lokal in geringsten Dosen freigesetzten Substanzen durchaus zu einer gegenteiligen Reaktion, zu einer Blockierung des Immunsystems

führen. Daher ist die systemische Anwendung von Zytokinen, obwohl sie sich in vielen Fällen als hilfreich erwiesen hat, grundsätzlich falsch und nicht physiologisch.

Die lokale Anwendung von Zytokinen ist ebenfalls problematisch, da die Zytokinmoleküle wegen ihrer geringen Größe sehr schnell vom Ort der Applikation weg ins Gewebe hineindiffundieren und sich diffus im Gewebe verteilen. Wegen ihrer geringen Halbwertszeit im Serum sind sie auch nur sehr kurze Zeit wirksam. Eigentlich gibt es nur eine einzige Form der Applikation, die man mit Einschränkungen "lokal" nennen könnte, das ist die Applikation in Form eines Sprays zur Therapie von Lungenmetastasen von Nierenzellkarzinomen (11). Bei dieser Applikationsform geht man davon aus, daß die Tumorläsionen vom Zytokin in relativ hoher Konzentration direkt erreicht werden können.

Nachdem Zytokine, vor allem das IL-2, in gentechnisch produzierter Form in größeren Mengen zur Verfügung standen, hat man sie auch, zusätzlich zu der oben beschrieben aus inaktivierten Tumorzellen und einem Adjuvants bestehenden Tumorvakzine, in der ASI eingesetzt. Dabei wurde rIL-2 sowohl systemisch, zur Unterstützung des Immunsystems bei der ASI, als auch lokal, zusammen mit der Tumorvakzine, verabreicht (12). Es muß allerdings davon ausgegangen werden, daß beide Formen der Zytokinapplikation kaum zufriedenstellende Ergebnisse liefern werden. Bei der systemischen Applikation verteilt sich das Interleukin im ganzen Organismus und wird daher seinen eigentlichen Wirkort, d. h. die Stelle, an der die Tumorvakzine appliziert worden ist, nur in geringsten Konzentrationen erreichen, im übrigen aber das ganze Immunsystem infolge der Überschwemmung mit diesem Zytokin lahmlegen. Bei der lokalen Applikation muß davon ausgegangen werden, daß das zusammen mit der Tumorzellen applizierte Zytokin sich innerhalb kürzester Zeit so stark verdünnt, daß es kaum zur Wirkung am gewünschten Wirkort kommt.

In den letzten Jahren haben mehrere auf diesem Sektor arbeitende Gruppen versucht, die Wirkung der Zytokine auf die Induktion einer Immunität gegen Antigene von Tumorzellen am Ort der Applikation dadurch zu erreichen, daß sie die Tumorzellen selbst mit dem Zytokin kodierenden Gen transfiziert und so zu Zytokin-Produzenten gemacht haben (13). Diese Zytokingen-transfizierten Zellen wurden bisher nur in Tierversuchen angewendet. Dabei werden die Zellen in ihrer vitalen Form appliziert, da vitale Zellen notwendig sind, um die den Zellen transfizierten Gene auch zur Expression bringen zu können. Nach diesem Prinzip wurden inzwischen Tumorzellen der verschiedensten Art mit den verschiedensten Zytokingen transfiert und Versuchstieren, vor allem Mäusen, appliziert. Bei diesen Versuchen wurde — erwartungsgemäß — beobachtet, daß die Tumorzellen zunächst angingen, d. h. sich teilten und einen Tumor bildeten. Nach einigen Tagen nahm die Tumormasse jedoch wieder ab, und schließlich verschwand der Tumor wieder vollständig. Während dieser Zeit war in den so behandelten Tieren systemisch keine erhöhte Zytokinaktivität nachweisbar. Danach waren die Tiere immun gegen eine "Infektion" mit vitalen Tumorzellen desselben Genotyps, jedoch nicht gegenüber anderen Tumoren.

In weiteren Versuchen zeigte es sich, daß auch gegen andere, nicht Zytokingen-transfizierte, Tumorzellen Immunität induziert werden konnte, wenn diese Tumorzellen gemischt mit den Zytokingen-transfizierten Tumorzellen appliziert wurden (14). Offensichtlich kommt es

darauf an, daß beide Reize, der von den Tumorzellen ausgehende Antigenreiz und der von den Zytokinen ausgehende und auf die Zellen des Immunsystems wirkende Stimulationsreiz, von derselben Lokalisation innerhalb des Organismus kommt. Daher wurden auch Versuche unternommen, eine Stimulation gegen Tumorzellen zu erreichen, indem man den Tumorzellen, gegen die Immunität erzeugt werden sollte, nicht Zytokingen-transfizierte Tumorzellen einer anderen Tumorart, sondern Zellen einer Linie nicht transformierter somatischer Zellen, beimischte, die mit einem Zytokingen transfiziert worden waren. Hierzu wurden vor allem Fibroblasten verwendet, da sie sich leicht isolieren lassen und im Organismus eine sehr kurze Halbwertszeit (einige Wochen) besitzen (15).

Die Übertragung eines dieser Therapieansätze mit transfizierten Tumorzellen oder mit transfizierten somatischen Zellen auf den Menschen dürfte kaum zu realisieren sein. Zum einen ist die Übertragung lebender Tumorzellen auf einen Patienten mit unabschätzbar großen ethischen Risiken verbunden. In Tierversuchen konnte inzwischen nachgewiesen werden, daß durchaus nicht alle Tiere diese Manipulation überleben (16). Durch Verlust des übertragenen Gens, wie er bei solchen Manipulationen immer auftreten kann, kann es zum Wachstum der transplantierten Tumorzellen und zur Entstehung eines Tumors kommen. Ein solches Risiko kann beim Menschen auf keinen Fall in Kauf genommen werden. Man hat daher versucht, dieses Risiko dadurch zu verringern, daß man die Tumorzellen letal bestrahlt und sich damit zufrieden gibt, daß die in den so bestrahlten Zellen enthaltenen Zytokine eben nur einige wenige Tage lang zur Expression kommen und die Zellen daher nur geringe Mengen des Zytokins während einer nur sehr kurzen Zeitspanne sezernieren. Damit wird natürlich die Wirksamkeit der Methode stark eingeschränkt.

Auch die Anwendung von Zytokingen-transfizierten somatischen Zellen, wie z. B. autologen Fibroblasten, ist mit großen Risiken verbunden. So konnte im Tierversuch gezeigt werden, daß solche Zytokingen-transfizierten Fibroblasten durchaus auch das Wachstum von Tumoren fördern können. Fibroblasten sind nämlich an der Ausbildung der bindegewebigen Matrix des Tumors beteiligt, und Zytokine spielen beim Aufbau dieser Matrix ebenfalls eine Rolle. Es konnte auch gezeigt werden, daß die Zellen mancher Tumorarten Rezeptoren für Zytokine tragen und folglich durch Zytokine zum Wachstum angeregt werden können. Dies ist für Zellen der lymphoiden Linie schon lange bekannt; es konnte kürzlich jedoch auch für Zellen von menschlichen Nierenzellkarzinomen (17) gezeigt werden.

Zu all dem kommt die Problematik der Kultivierung und Transfektion der zu verwendenden Tumorzellen. Die zu transfizierenden autologen Tumorzellen bzw. die autologen Fibroblasten müssen ja vor Beginn der Therapie nicht nur gewonnenen, sondern auch an in vitro-Kulturbedingungen adaptiert werden, bevor sie transfiziert werden können. Nach der Transfektion müssen unter den vielen erhaltenen Transfektanten die am besten geeigneten ausgewählt werden. Alle diese Manipulationen sind mit einem beträchtlichen personellen und Kosten-Aufwand verbunden und stehen der routinemäßigen Anwendung eines solchen Tumortherapiekonzepts im Wege, insbesondere wenn man bedenkt, daß es sich bei dieser Therapieform um die Therapie von Individuen mit einer für jedes Individuum individuell herzustellenden Vakzine handelt.

Aus all diesen Gründen wird ein Therapiekonzept, das auf der Applikation von Zytokingen-transfizierten lebenden autologen Tumorzellen oder Fibroblasten an Patienten basiert, kaum oder nur unter größten Schwierigkeiten und Risiken zu realisieren sein. Es ist daher notwendig, nach einem alternativen Konzept zu suchen, bei dem dasselbe Ziel auf anderen weniger aufwendigen und für den Patienten mit geringeren Risiken belasteten Wegen erreicht werden kann.

In den Originalarbeiten, in denen über die Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen mit Zytokingen-transfizierten Tumorzellen berichtet wird (18) sowie auch in den Übersichtsarbeiten, die sich kritisch mit den bei diesen Versuchen erhaltenen Ergebnisse auseinandersetzen, wird immer wieder hervorgehoben, daß das entscheidende Ergebnis dieser Versuche die Feststellung ist, daß der Antigenreiz und der Zytokinreiz von exakt derselben Lokalisation, nämlich der Tumorzelle oder von einer direkt der Tumorzelle benachbarten Zelle kommen muß, um eine Immunität gegen Antigene des Tumors zu erzeugen. Es muß also nach einem anderen Weg gesucht werden, um diese beiden Reize in oder an der Tumorzelle selbst oder in ihrer unmittelbaren Nähe zur Wirkung zu bringen.

Es ist die Aufgabe dieser Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, das es ermöglicht, die beiden Reize, den Antigenreiz und den Zytokinreiz, von sehr nahe beieinander liegenden Lokalisationen ausgehen zu lassen. Zur Lösung dieser Aufgabe wird vorgeschlagen, daß die Zytokine der Tumorvakzine in Form eines Depots zugeführt werden, aus dem sie über einen längeren Zeitraum freigesetzt werden.

Die Vorteile eines solchen Verfahrens sind vielfältig:

- die Zytokine werden nicht nur einmal, sondern über einen langen Zeitraum freigesetzt und können dadurch über einen langen Zeitraum immunstimulierend wirken.
- Bei Zytokingen-transfizierten Zellen ist die zelluläre Zytokin-Produktionsrate nur sehr gering (unter  $1,0 \text{ ng}/10^6 \text{ Zellen}$ ). Daher kommt es erst dann zu einer signifikanten Zytokinproduktion, wenn bereits eine beträchtliche Tumormasse entstanden ist. Im Gegensatz dazu ist bei der Applikation einer Tumorvakzine, die das Zytokin in Depotform enthält, von ersten Moment der Applikation eine relativ höhere Zytogendosis vorhanden.
- Im Vergleich zu der systemischen Applikation von Zytokinen hat die vorgeschlagene lokale Applikation in Depotform den Vorteil, daß keine Nebenwirkungen zu erwarten sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann beispielsweise folgendermaßen ausgeführt werden:

#### Beispiel 1

Herstellung einer Tumorvakzine nach Anspruch 10, bei der Liposomen, in denen das Zytokin IL-2 eingeschlossen ist, den Tumorzellen beigemischt werden

Die Herstellung von Zytokin-haltigen Liposomen ist in der Literatur (19, 20) sowie auch in Patenten ausführlich beschrieben. Bei den diesem Patentantrag zugrundeliegenden Versuchen wurde rIL-2 nach diesen Verfahren encapsuliert. Für die Herstellung der Liposomen wurde ein Verhältnis von PC : Cholesterol : PE von

28 : 42 : 1 angewendet. Dabei werden Liposomen erhalten, die typischerweise 12 µg rIL-2/ml enthielten. Es ist jedoch auch möglich, andere Phospholipid-Zusammensetzungen für die Herstellung der Zytokin-enthaltenden Liposomen verwendet.

Bei der Anwendung wurden den Versuchstieren (Mäusen das Stammes C57BL/6)  $10^5$  bestrahlte (200 Gy) Tumorzellen zusammen mit 3 µg rIL-2 in Liposomen-eingeschlossener Form appliziert. Mit der so hergestellten Vakzine wurde eine wesentliche Verbesserung der Überlebensraten der behandelten Mäuse nach Challenge mit vitalen Tumorzellen erreicht.

### Beispiel 2

**Herstellung einer Tumorvakzine nach Anspruch 11, bei der Liposomen, in denen das Zytokin IL-2 eingeschlossen ist, kovalent an die Tumorzellen gebunden werden**

Hierzu wurden die rIL-2-haltigen Liposomen auf dieselbe Weise wie unter Beispiel 1 hergestellt. Anschließend wurden sie nach der Methode von Partis (21) mit MHS (Maleimidohexanoyl-N-Hydroxy-Succinimid) behandelt. Es wurde ein 5-fach molarer Überschuß von MHS bezogen auf das liposomale PE eingesetzt.

Parallel dazu wurden die Tumorzellen zur Einführung von SH-Gruppen nach der Methode von Ishikawa (22) mit SAMB (S-Acetyl-Mercapto-Bernsteinsäureanhydrid) behandelt. Die Zellen waren nach der Behandlung noch vital und konnten erneut *in vitro* kultiviert werden.

Die Bindung der Liposomen an die aktivierte Tumorzellen erfolgte durch Zusammenmischen der MHS-aktivierten rIL-2-Liposomen-Suspension mit der SAMB-aktivierten Tumorzellsuspension. Die Bindung erfolgt durch Ausbildung von Thioätherbrücken zwischen den Liposomen und den Tumorzellen. Die Bindung der Liposomen an die Tumorzellen konnte fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe von Liposomen nachgewiesen werden, die FITC-markiertes rIL-2 enthielten. Auch in der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung ließen sich Tumorzell-gebundene Liposomen nachweisen.

Zur Bestimmung des IL-2-Gehalts der Liposomen-Tumorzell-Konjugate wurden sie in Triton-X100 lysiert und der IL-2-Gehalt anschließend in einem ELISA bestimmt. Es wurden Werte von 30 µg rIL-2 pro  $10^6$  Zellen nachgewiesen.

Bei der Anwendung wurden den Versuchstieren (Mäusen das Stammes C57BL/6)  $10^5$  bestrahlte (200 Gy) Tumorzellen in Form von rIL-2-Liposomen-Tumorzell-Konjugaten mit 3 µg rIL-2 in liposom-eingeschlossener Form appliziert. Mit der so hergestellten Vakzine wurde eine wesentliche Verbesserung der Überlebensraten der behandelten Mäuse nach Challenge mit vitalen Tumorzellen erreicht.

### Literaturreferenzen

- 1: Specific Immunotherapy of Cancer with Vaccines. J.-C. Bystryn, S. Ferrone and P. Livingston, eds. Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 690, 1993
- 2: Orefice, S., Cascinelli, N., Valini, M. et al. 1978 Intravenous administration of BCG therapy in advanced melanoma patients. *Tumori* 64, 437–443
- 3: Peters, L.C., Brandhorst, J.S. and Hanna jr, M.G. 1979. Preparation of immunotherapeutic autologous tumor cell vaccines from solid tumors.
- 4: Tallberg, T. and Tykkä, H. 1986. Specific active immunotherapy in advanced renal cell carcinoma. A clinical longterm follow-up study. *World J Urology* 3, 234–244
- 5: Cassel, W. A., Murray, D.R. and Phillip, H. S. 1983 A phase II study on the postsurgical management of stage II malignant melanoma with a Newcastle Disease Virus oncolysate. *Cancer* 52, 856–860
- 10: Schirrmacher, V., Ahlert, T., Heicappel, R., Appelhans, B. and von Hoegen, P. 1986 Successful application of non-oncogenic viruses for antimetastatic cancer immunotherapy. *Cancer Reviews* 5, 19–49
- 7: Schirrmacher, V. 1992 Immunity and metastasis : in situ activation of protective T cells by virus-modified cancer vaccines. *Cancer Survey* 13, 129–154
- 8: Schirrmacher, V., von Hoegen, P., Griesbach, A. and Zangemeister-Wittke, U. 1991 Specific eradication of micrometastasis by transfer of tumor-immune T-cells from MHC-congenic mice. *Cancer Immunol. and Immunother.* 32, 373–381
- 9: Forni, G., Giovarelli, M., Santoni, A., Modesti, A. und Forni, M. (1987) Interleukin-2 activated tumor inhibition *in vivo* depends on the systemic involvement of host immunoreactivity. *Journal of Immunology* 138: 4033–4041
- 10: Waldmann, T. A. (1993) The IL-2/IL-2 receptor system: A target for rational immune intervention. *Immunology Today* 14: 264–270
- 30: 11: persönliche Information erhalten auf dem 21. Deutschen Krebskongress 1994 in Hamburg.
- 12: Pomer, S., Thiele, R., Daniel, V., Weimer, R., Lörke, H., Schirrmacher, V. and Staehler, G. 1991 Sequential treatment of patients with advanced renal cell carcinoma with autologous tumor vaccine and subcutaneous administration of recombinant Interleukin-2 and Interferon-alpha2b. *World J. Urology* 9, 223–227
- 35: 13: Karasuyama, H. und Melchers, F. (1988) Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of Interleukin 2, 3, 4, or 5, using modified cDNA expression vectors. *European Journal of Immunology* 18: 97–104
- 40: 14: Pardoll, D. New Strategies for Active Immunotherapy with Genetically Engineered Tumor Cells. *Current Opinion in Immunology* 4, 619–623, 1992
- 45: 15: Sobol, R. E., Fakhrai, H. und Gjerset R. (1992) Active tumor immunotherapy with transduced fibroblasts. *Protocols of the American Association of Cancer Research* 33: 495–502
- 50: 16: Tsai, J., Gansbacher, B., Tait, L., Miller, S.R. and Heppner, G.H. Induction of Antitumor Immunity by Interleukin-2 Gene-Transduced Mouse Mammary Tumor Cells versus Transduced Mammary Stromal Fibroblasts. *J. Nat. Cancer Inst.* 85, 546, 552, 1993
- 55: 17: Obiri, N.I., Hillman, G., Haas, G.P., Sud, S. and Puri, R.K. 1993, *J Clin. Invest.* 91, 88
- 18: Fearon, E.R., Pardoll, D.M., Itaya, T., Golumbek, P., Levitsky, H.I., Simons, J., Kakasuyama, H., Vogelstein, B., und Frost, P. Interleukin-2 production by tumorcells bypasses T-helper function in the generation of an antitumor response. *Cell*, 60: 397–403 (1990)
- 60: 19: Adler, A., Schachter, J., Barenholz, Y., Klein, T., Prigozhina, T. und Kedar, I. (1993). Clinical and immunological effects of allogenic human liposomal melanoma vaccine with/without IL-2: An update. (Abstract). *Journal of Immunotherapy* 14: 359
- 65: 20: Hoffmann, J., Bimmler, M., Lasch, J. und Giesemann, P. (1993). Tumorstatic activity of liposomes reconstitu-

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

ted from tumor associated antigens and Interleukin 2 for immunotherapy of fibrosarcomas in Balb/c mice.

21: Partis, M.D. et al. 1983 Cross-linking of proteins by omega-maleimido-alkanoyl-N-hydroxysuccinimido Esters. *J. Protein Chem.* 2, 263-270

22: Ishikawa, E., Hashida, S., Kohno, T., Kotani, T. and Ohtaki, S. (1987) Modification of Monoclonal Antibodies with Enzymes, Biotin, and Fluorochromes and Their Applications. In: L.B. Schook (Ed.), *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 2. Ed., Marcel Dekker Inc., New York, p. 113.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer Tumorvakzine für die Aktive Spezifische Immuntherapie (ASI), bestehend aus intakten inaktivierten Tumorzellen und Zytokinen, dadurch gekennzeichnet, daß die Zytokine der Tumorvakzine in Depotform beigegeben werden. 15
2. Verfahren nach 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zytokine kovalent an die Tumorzellen gebunden werden.
3. Verfahren nach 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zytokine kovalent an ein Protein mit Affinität für Strukturen der Tumorzellen gebunden werden. 25
4. Verfahren nach 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zytokine in Form von Fusionsproteinen, bestehend aus einem Zytokin und einem Protein mit Affinität für Strukturen der Tumorzellen, an die Tumorzellen gebunden werden. 30
5. Verfahren nach 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zytokine in Liposomen eingeschlossen werden.
6. Verfahren nach 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zytokine polymerisiert werden. 35
7. Verfahren nach 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zytokine an biologisch abbaubare (biodegradable) Polymere gebunden werden.
8. Verfahren nach 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zytokine adsorptiv an anorganische Partikel gebunden werden. 40
9. Verfahren nach 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zytokine an Viruspartikel gebunden werden.
10. Verfahren nach 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen den Tumorzellen beigemischt werden. 45
11. Verfahren nach 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Liposomen kovalent an die Tumorzellen gebunden werden.
12. Verfahren nach 6, dadurch gekennzeichnet, daß die polymerisierten Zytokine den Tumorzellen beigemischt werden. 50
13. Verfahren nach 6, dadurch gekennzeichnet, daß die polymerisierten Zytokine kovalent an die Tumorzellen gebunden werden. 55
14. Verfahren nach 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zytokin-enthaltenden biologisch abbaubare Polymeren den Tumorzellen beigemischt werden.
15. Verfahren nach 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zytokin-enthaltenden biologisch abbaubare Polymeren kovalent an die Tumorzellen gebunden werden. 60
16. Verfahren nach 8, dadurch gekennzeichnet, daß die an anorganische Partikel adsorbierten Zytokine den Tumorzellen beigemischt werden. 65
17. Verfahren nach 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zytokin-enthaltenden Viruspartikel den Tumorzellen beigemischt werden.

18. Verfahren nach 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zytokin-enthaltenden Viruspartikel kovalent an die Tumorzellen gebunden werden.
19. Verfahren nach 1, dadurch gekennzeichnet, daß IL-2 als Zytokin Verwendung findet.
20. Verfahren nach 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß Antikörper als Proteine mit Affinität zu Tumorzellen verwendet werden.
21. Verfahren nach 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß Lektine als Proteine mit Affinität zu Tumorzellen verwendet werden.
22. Verfahren nach 7, dadurch gekennzeichnet, daß Polymere aus Milchsäure (Poly-Lacide) verwendet werden.
23. Verfahren nach 8, dadurch gekennzeichnet, daß Aluminiumhydroxyd oder Calciumphosphat als adsorbierende Partikel verwendet werden.

BEST AVAILABLE COPY

- Leerseite -

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**